

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 30日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790694

研究課題名（和文） ヒト単球由来細胞における salusin- β の産生・分泌機構研究課題名（英文） Secretion of salusin- β from human monocyte-derived cells.

研究代表者

佐藤 健吾 (SATO KENGO)

東京薬科大学 生命科学部 心血管医科学研究室・助教

研究者番号：70549930

研究成果の概要（和文）：単球性白血病細胞株である THP-1 および U937 細胞はサリューシン- β を合成・分泌していた。また、単球およびマクロファージからサリューシン- β が分泌されていることからサリューシン- β は粥状動脈硬化症においてオートクリン・パラクリン作用を有し、炎症性サイトカインは細胞内プロサリューシンのプロセッシングを誘導している可能性があり、動脈硬化治療の新たな標的分子になる可能性が示唆された。Radioimmunoassay 系では血中濃度の測定には至っていないため、血中濃度測定可能なサンドイッチ ELISA 系の確立をした。健康人の血漿中サリューシン- β 濃度は約 1 nmol/L であった。今後は ELISA で動脈硬化性疾患患者のサリューシン- β 血中濃度を測定し、病態生理学的意義およびバイオマーカーとしての有用性を検討していく。

研究成果の概要（英文）：Salusin- β is released from human monocytes/macrophages suggest a possible autocrine/paracrine role in the development and progression of atherosclerosis. Inflammatory cytokines induced secretion was not the result of preprosalusin gene induction, but might have been caused by increased intracellular processing of prosalusin. Our results implicate that salusin- β could be a novel therapeutic target for the prevention of atherosclerosis. It has been impossible to accurately measure plasma salusin- β levels by radioimmunoassay, therefore, we have established a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) suitable for detection of immunoreactive salusin- β in human plasma. The salusin- β -like immunoreactivity in normal human plasma was about 1 nmol/L. Prospective studies of salusin- β that examine relationships with plasma salusin- β levels and severity of atherosclerosis by ELISA and the usefulness of salusin- β as a biomarker for atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：動脈硬化、血管作動性物質、単球、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患や脳血管障害などの動脈硬化性疾患の主要な危険因子として生活習慣病（高血圧、脂質異常症、糖尿病等）があり、個々に治療されているが、現状では良好な成

績には至っていない。そのため、動脈硬化の新たな治療法および動脈硬化の病態を把握するための信頼できるバイオマーカーが求められている。

動脈硬化の初期病変に特徴的な病理所見に、

酸化LDL由来のコレステロールエステルを蓄積したマクロファージ由来泡沫細胞の集簇がある。血管平滑筋細胞の遊走・増殖を伴い動脈硬化病変は更に進展する。我々は、初代培養したヒト単球由来マクロファージへのコレステロールエステルの蓄積（泡沫化）を指標とし、cDNAライブラリーのバイオインフォマティクス解析により同定されたサリューシン-βが、細胞内コレステロールエステル化酵素であるAcyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1の発現促進を介したヒト単球由来マクロファージ泡沫化促進により動脈硬化を進展させることを既に報告している（Circulation 2008;117:638-648）。つまり、サリューシン-βは動脈硬化を強力に制御する内因性因子であると同時にマクロファージや単球系細胞における分泌作用が重要である。

2. 研究の目的

サリューシン-βは動脈硬化を強力に制御する内因性因子であり、マクロファージや単球系細胞における産生・分泌機構の解明が非常に重要である。そこで、ヒト単球系細胞株であるTHP-1およびU937細胞や初代培養ヒト単球由来マクロファージにおけるサリューシン-βの発現・分泌動態・制御機序を明らかにする。また、radioimmunoassay系では血中濃度の測定には至っていないため、血中濃度測定可能なenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)系の確立を試みる。これらによりサリューシン-βが動脈硬化の治療標的分子となる可能性、あるいはバイオマーカーとしての有用性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) mRNAの定量的解析；単球性白血病細胞株であるTHP-1およびU937細胞において、エクソン3と5の間を認識するTaqManプローブを用いたリアルタイムPCRによりプレプロサリューシン mRNA発現の定量的解析を行った。また、炎症性サイトカイン刺激16時間後の細胞における解析も行った。

(2) プロセッシング機構の解析；サリューシン-αおよび-βペプチド抗体を用いたウエスタンブロット解析によりTHP-1およびU937細胞や初代培養ヒト単球由来マクロファージ内におけるプロサリューシンからのプロセッシング機構について検討した。

(3) 逆相高速液体クロマトグラフィー；THP-1およびU937細胞の培養上清抽出物、合成サリューシン-β標準品をAKTA Explorer 10S HPLCシステムを使用して逆相高速液体クロマトグラフィーを行い、産生・分泌されているサリューシン-βの分子型の評価をし

た。

(4) THP-1 および U937 細胞の分泌動態の検討；両細胞の細胞の無血清培養上清（2、4、6、24、48 時間）を回収した。また、両細胞を12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA、150 nM) で48時間培養してマクロファージへと分化誘導させた後、無血清培養上清（2、4、6、24、48時間）を回収した。さらに、動脈硬化の病態に関係の深い炎症性サイトカイン（LPS、IL-1β、TNF-α等）の作用について検討するため、プロテアソーム阻害薬であるMG-132の有無で、IL-1β、LPS、TNF-α等を加え、無血清培養上清（2、4、6、16、24時間）を回収した。回収した培養上清をサリューシン-βRIAに使用した。

(5) 初代培養ヒト単球由来マクロファージの調整；ヒト末梢血をヘパリン採血し、Picoll-PaqueとCD14マイクロビーズを用いてAutoMACSにより単球を分離した。この単球をヒト血清10%含有RPMI 1640で7日間培養することでマクロファージへと分化させた。分化途中である培養1、3、5、7日目の培養上清を回収し測定し、健常ヒトと白血病細胞株であるTHP-1およびU937細胞との比較を行った。

(6) サンプルの抽出と測定

THP-1細胞、U937細胞、ヒト単球由来マクロファージから回収した培養上清および健常ボランティアから得られた健常ヒト血漿は、Sep-Pak C18カートリッジを用いて、70%アセトニトリルで溶出した。その抽出物を、培養上清はウサギ抗ヒトサリューシン-β抗体を用いたRIAで、血漿はウサギ抗ヒトサリューシン-β抗体およびトリ抗ヒトサリューシン-β IgY抗体を用いたサンドイッチELISAで測定した。

4. 研究成果

(1) THP-1 および U937 細胞のリアルタイム RT-PCR およびウエスタンブロットにおいて、前駆体であるプレプロサリューシン mRNA およびタンパク発現を確認した。無血清培養上清をRIAで測定すると、両細胞はサリューシン-βを分泌しており、TPAで単球からマクロファージへと分化誘導させると分泌量は著明に増加した。THP-1細胞培養上清抽出物の逆相高速液体クロマトグラフィー画分の免疫活性のピークはサリューシン-β標準品と一致しており、分泌されている分子型は20アミノ酸であった。炎症性サイトカインで刺激を行うと、THP-1細胞ではLPS刺激で、U937細胞ではLPSおよびTNF-α刺激で有意に分泌量が増加したが、mRNAの変化は無かった。

(2) ヒト全血から Ficoll-Paque と CD14 マイクロビーズ抗体を用いて単球を調製し、7 日間培養してマクロファージに分化させた。分化した培養マクロファージ（または分化段階）の培養上清を測定したが今回の条件では測定感度以下であった。さらに、ウエスタンブロットによりタンパク発現を解析したところ、前駆体のプレプロサリューシンが検出されたが、サリューシン-β は検出されず、初代培養した単球およびマクロファージでは発現量が少なかった。

(3) Radioimmunoassay 系では血中濃度の測定には至っていないため、従来から使用していたウサギ抗ヒトサリューシン-β 抗体と認識エピトープが異なるトリ抗ヒトサリューシン-β IgY 抗体を作製し、血中濃度測定可能なサンドイッチ ELISA 系を確立した。サンプルは Sep-pak C18 カラムを用いてアセトニトリルで抽出して干渉物質を除いた血漿で測定可能であった。健康人の血漿中サリューシン-β 濃度は約 1 nmol/L であった。また、男女差は認められなかった。

以上より、THP-1 および U937 細胞はサリューシン-β を合成・分泌していた。また、単球およびマクロファージからサリューシン-β が分泌されていることからサリューシン-β は粥状動脈硬化症においてオートクリン・パラクリン作用を有し、炎症性サイトカインは細胞内プレプロサリューシンのプロセッシングを誘導している可能性があり、動脈硬化性疾患との関連が強く示唆された。今後は ELISA で動脈硬化性疾患患者のサリューシン-β 血中濃度を測定し、病態生理学的意義およびバイオマーカーとしての有用性を検討していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Tani Y, Sato K, Kusano K, Kishi F, Susumu T, Suzuki-Kemuriyama N, Izumiyama H, Yamawaki M, Okayasu I, Shichiri M. The soluble prorenin receptor extracellular domain as the major molecular form. *Journal of Endocrinology* 2012 in press.
2. Watanabe T, Sato K, Itoh F, Wakabayashi K. New Novel Peptides as Biomarkers for Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Sensors* 2012 in press.
3. Watanabe T, Sato K, Itoh F, Iso Y.

Pathogenic involvement of heregulin-β₁ in anti-atherogenesis. *Regul Peptides* 2012;175:11-14.

4. Suzuki N, Shichiri M, Tateno T, Sato K, Hirata Y. Distinct systemic distribution of salusin-α and salusin-β in the rat. *Peptides* 2011;32:805-810.
5. Watanabe T, Sato K, Itoh F, Iso Y, Nagashima M, Hirano T, Shichiri M. The roles of salusins in atherosclerosis and related cardiovascular diseases. *J Am Soc Hypertens* 2011;5:359-365.
6. 佐藤健吾、小山高敏、七里眞義。サリューシン-β の物理化学的特性の検討と radioimmunoassay 系の確立。 *臨床病理* 2011;59:121-127.
7. Nagashima M, Watanabe T, Shiraiishi Y, Morita R, Terasaki M, Arita S, Hongo S, Sato K, Shichiri M, Miyazaki A, Hirano T. Chronic infusion of salusin-α and -β exerts opposite effects on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2010;212:70-77.
8. Kimoto S, Sato K, Watanabe T, Suguro T, Koyama T, Sasaki S, Shichiri M. Serum levels and urinary excretion of salusin-α in renal insufficiency. *Regul Pept* 2010;162:129-132.
9. Sato K, Fujimoto K, Koyama T, Shichiri M. Release of salusin-β from human monocytes/macrophages. *Regul Pept* 2010;162:68-72.

[学会発表] (計 4 件)

1. 伊東史子、佐藤健吾、渡部琢也。生命をむさぼる脈管系の暴走：血管研究の新展開。第一回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム 2011 年 7 月、東京。
2. 藤本和美、佐藤健吾、七里眞義、小山高敏。動脈硬化促進因子 salusin-β の分泌と ELISA 系の確立。第 40 回日本心脈管作動物質学会 2011 年 2 月、香川。
3. 藤本和美、佐藤健吾、七里眞義、小山高敏。ヒト単球由来細胞からの salusin-β 分泌及び ELISA 系の確立。第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月、兵庫。
4. 藤本和美、佐藤健吾、七里眞義、小山高敏。ヒト単球及びマクロファージからの

salusin- β 分泌と salusin- β サンドイッチ
ELISA 系の確立。第 57 回 日本臨床検査
医学会 2010 年 9 月、東京。

〔図書〕 (計 1 件)

1. 佐藤健吾、七里眞義。サリューシン- α , - β 。
日本臨床増刊号、広範囲 血液・尿化学
検査、免疫学的検査 (第7版) 4—その数値
をどう読むか—XII. 内分泌学的検査。日
本臨床社 2010;659-663。

〔その他〕

ホームページ等

<http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~cardiovasc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 健吾 (SATO KENGO)

東京薬科大学 生命科学部 心血管医科学
研究室・助教

研究者番号：70549930